

APETALA1 基因启动子的克隆与功能分析

蒋 瑶^{1,2}, 戚晓利^{1,3}, 赵树堂¹, 卢孟柱^{1*}

- (1. 中国林业科学研究院林业研究所, 林木遗传育种国家重点实验室, 北京 100091;
2. 中南林业科技大学, 经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 湖南长沙 410002;
3. 佳木斯大学生命科学学院, 黑龙江佳木斯 154007)

摘要:为了分析 *AP1* 的表达调控模式,本研究克隆了拟南芥花异常株系 AFDL 的 *AP1* 启动子,启动子元件预测结果表明:*AP1* 启动子中含有 3 个结合 MADS 调控因子的 CArG box(从 5'依次编号为 CArG1、CArG2、CArG3),通过删减 *AP1* 启动子长度以及改变 CArG box 数量构建了 5 个 GUS 表达载体并转化野生型拟南芥。测序结果显示:AFDL 的 *AP1* 启动子在核苷酸序列上与野生型拟南芥完全一致,这表明 *AP1* 在 AFDL 中的表达显著降低并不是启动子序列突变引起的;转基因植株的 GUS 表达模式说明了 CArG1 在花发育早期及后期激活基因的表达,CArG2 在整个后期都对基因的表达有抑制作用,而 CArG3 在花发育初期就能抑制基因的表达,并且在后期仍然保持了对下游基因的抑制作用,CArG box1、2、3 对 *AP1* 的表达有显著但非决定性的影响。此外,还推测在 *AP1* 启动子 0~-3 579 bp 范围之外存在影响 *AP1* 在第 4 轮花器官表达的调控元件,-3 579 bp 至 -1 752 bp 区域可促进 *AP1* 的表达,而 *AP1* 启动子 -1 759 bp 至 -1 359 bp 区域除 CArG2 外的其它元件对调节其表达无明显作用。

关键词:启动子;*APETALA1*;CArG box;分生组织;形态建成;GUS 染色

中图分类号:S718.46

文献标识码:A

Cloning and Functional Analysis of *APETALA1* Promoter

JIANG Yao^{1,2}, QI Xiao-li^{1,3}, ZHAO Shu-tang¹, LU Meng-zhu¹

- (1. Research Institute of Forestry, State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;
2. Central South University of Forestry and Technology, The Key Lab of Non-wood Forest Products of State Forestry Administration, Changsha 410002, Hunan, China; 3. School of Life Sciences, Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang, China)

Abstract: *APETALA1* is an important MADS box gene involved in the regulatory pathway of flowering. The expression of the *AP1* decreases dramatically in the Abnormal Flower Development Line (AFDL) of *Arabidopsis*. AFDL is absent of petals and with a stacked inflorescence meristems. In order to analysis the matically in the Abnormal Flower Development Line (AFDL) of *Arabidopsis*. AFDL is absent of petals and with a stacked inflorescence meristems. In order to analysis the regulation of the promoter of *AP1*, the -3 579 bp promoter region of *AP1* was cloned from AFDL. The functional element predication indicated that three CArG boxes, the binding sites for the MADS regulator, were located in the promoter (the three boxes were identified by progressive number as CArG1, CArG2, CArG3 form). 5 vectors were constructed with the promoters of *AP1* to drive *GUS* in wild-type, which with different length and number of the CArG boxes. The sequence of *AP1* in AFDL was the same as that of wild-type, that indicated that the significant down-regulation of *AP1* was not associated with the CArG boxes as well as its sequenced; And the GUS staining of the transformed plants showed that the CArG1 was the binding site for positively acting factor(s)

收稿日期:2012-08-24

基金项目:林业公益性行业科研专项重点项目“重要乡土树种核心种质评价及高效育种共性技术研究”(201004009)

作者简介:蒋 瑶(1983—),女,讲师,主要从事林业生物技术研究。

* 通讯作者:男,博士,研究员,主要从事树木性状形成的分子基础及基因工程调控研究。

during the early stage and the later stage of the flower development, and the deletion of the CArG2 and the mutations in CArG3 resulted in an increase in the level of reporter gene activity during the early or later floral stages, suggesting that CArG2 and CArG3 are the binding sites for negatively regulators. Therefore the three CArG boxes in the promoter of *AP1* are functional on the regulation the *AP1* expression rather than determinant expression of *AP1*. The ectopic *GUS* expression in the whorl 4 indicated that there were unidentified elements that played a role on the expression specificity outside the 0 - -3 579 bp upstream of the transcriptional start site. In addition, there may be some elements located in the region from -3 579 bp to -1 752 bp but the region from -1 752 bp to -1 359 bp was nonfunctional on the regulation of *AP1* except the CArG2 box.

Key words: promoter; *APETALA1*; CArG box; meristem; plant morphogenesis; GUS staining

高等植物的成花诱导及花发育的分子遗传机制是发育生物学的研究热点,随着对成花基因的研究,逐渐发现一批在花器官形成中具有功能的特征基因在植物形态建成方面也起到了重要的调控作用。*APETALA1* (*AP1*) 是重要的成花基因,它不仅能作为花分生组织基因在花发育初期促进花的分化,而且还能调控萼片和花瓣的发育。研究者已从美洲山杨^[1]、蓝桉^[2]以及多种果树^[3-4]中克隆到 *AP1* 的同源基因,超表达 *AP1* 基因能明显缩短开花时间,促进树种开花,缩短其实生苗童期,加速种质改良进程。*AP1* 基因在植物成花过程中起关键作用,对其功能及表达模式作进一步研究,将有助于更深入地了解植物成花的生理生化过程。利用林木为材料难以在短时间内揭示林木花发育的规律,其较长的生长周期阻碍了林木遗传育种的研究,转基因是基因功能验证的一个重要途径,但是大多数林木的转基因技术尚不成熟。目前,对拟南芥开花有关的基因了解最多,功能也最清楚,拟南芥可以为林木分子育种提供重要的基因资源,因此,本文将利用拟南芥来验证 *AP1* 启动子是如何调控成花关键基因 *AP1* 的表达。开花途径中部分与 *AP1* 存在相互作用的基因能通过调控 *AP1* 来影响植株的生长发育^[5-9],这些基因不仅能够通过 *AP1* 调控花器官的形成,而且还影响了花序分生组织强度并改变整株的分枝情况,因此,越来越多的研究者关注开花功能基因对树木形态建成的研究^[10]。开花途径中的大多数功能基因都属于转录因子,它们通过结合到下游目的基因的启动子区域起到调控转录的作用。*LFY* 是直接结合到 *AP1* 启动子区域起激活作用的^[11]; *LEUNIG* (*LUG*) 与 *SEUSS* (*SEU*) 形成的复合物只有在 *AP1* 的介导下才能结合到 *AGMOUS* (*AG*) 上进行调控^[12],这些研究表明转录因子与调控元件作用的方式是复杂且多样的。在高等植物的花发育过程中 *MADS*-box 类转录

调控因子一般通过结合靶基因启动子上的 CArG box 基序来调控基因的表达,而且可以结合激活因子,如 *AP1* 以及 *AGL24* 分别通过 *LFY* 内含子以及启动子区内的 CArG box 基序来激活其表达^[13]; CArG box 也能结合抑制因子, *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) 在春化前能直接结合到 *FT* 第一内含子以及 *SUPPRESSOR OF CONSTANS OVEREXPRESSION* (*SOC1*) 和 *FD* 启动子区域的 CArG box 来抑制其表达^[14]; 同一基因上的 CArG box 能同时具备多种功能, *APETALA3* (*AP3*) 启动子中的 3 个 CArG box 不仅分别具有激活和抑制的调控作用,并且对 *AP3* 的表达模式也有一定的影响^[15]; 此外, CArG box 还与表观遗传修饰有关^[16]。多项研究表明 CArG box 对花发育途径中的功能基因有重要的调控作用。

花异常株系 *AFDL* 是一个花瓣缺失并且花序分生组织异常活跃的晚花型突变体,基因表达分析结果表明, *AFDL* 中 *AP1* 的表达量与野生型相比大约降低了 96 倍,但其基因组序列并未发生突变^[17]。从获得 *ap1* 突变体以来,对于 *AP1* 功能的研究已开展了多年^[18-19],然而对于 *AP1* 基因的调控元件及表达模式方面的研究还不是很明确。为了研究 *AFDL* 中 *AP1* 低表达的调控机制,克隆 *AFDL* 的 *AP1* 启动子序列并分析其序列特性,以删减启动子长度以及突变 CArG box 的方式构建了 5 种不同 *AP1* 启动子的 *GUS* 表达载体并转化野生型拟南芥。本实验旨在阐述 *AP1* 基因启动子中 CArG box 对于 *AP1* 表达调控和表达模式的作用,试图进一步揭示调控 *AP1* 基因表达的上游调控因子的作用位点,为深入研究 *AP1* 的调控机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 野生型拟南芥 (*Arabidopsis thali-*

ana Heynh.) 及拟南芥花异常株系 AFDL 的种子来自于拟南芥突变体资源中心(The Nottingham Arabidopsis Stock Centre, NASC), 均为 *Lers* 型拟南芥。大肠杆菌 *DH5 α* 购自 Transgen 公司, *pGEM-Teasy Vector* 购自 Promega 公司, 表达载体 *pCAMBIA1304* 及农杆菌 *GV3101* 均由中国林科院林木遗传育种国家重点实验室保存。

1.1.2 试剂 RNeasy[®] plant Mini Kit 试剂盒、RNase-free Dnase 试剂盒、PCR 产物回收试剂盒 QIAquick Gel Extraction Kit、质粒小量提取试剂盒 QIAprep Spin Miniprep Kit 均购自 Qiagen 公司; 反转录试剂盒 SuperscriptIII First-strand kit 购自 Invitrogen 公司; Prime STAR[™] HS DNA Polymerase、TaKaRa rTaq、DNA A-Tailing Kit、定量 PCR 试剂 SYBR[®] Premix EX Taq[™] II 等 DNA 聚合酶均购自 TAKARA 公司; 限制性内切酶及 DNA 连接酶购自 NEB 公司; 氨苄霉素、IPTG、X-gal 等购自 Sigma 公司; 使用的乙醇、异

丙醇、 β -巯基乙醇等常规试剂均为分析纯级。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥种植 所有的拟南芥种子均在湿润的滤纸上 4 °C 春化 3 d, 并播种在营养土: 蛭石 = 10:1 的混合土中, 薄膜覆盖至拟南芥发出子叶, 培养条件为 (22 ± 2) °C, 16 h 光照/8 h 的暗培养, 光照条件为 110 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 取用 30 d 植株的莲座叶为材料。

1.2.2 基因表达分析 分析野生型拟南芥以及 AFDL 的基因表达水平, 设计并合成了目的基因和内参基因的定量引物, 序列见表 1。分别以花序为材料, 提取总 RNA 并转录成第一链 cDNA, 操作按照说明书进行。按照 SYBR[®] Premix EX Taq[™] II 说明书体系进行 Real-time PCR, 以稀释 25 倍的第一链 cDNA 为模板, 采用 60 °C 退火, 重复 40 个循环的两步法, 并用相同退火温度进行溶解曲线扩增。每种样品重复 3 次, 每次进行 4 ~ 6 个技术重复。

表 1 定量 PCR 引物表

基因	正向引物(5' - 3')	反向引物(5' - 3')
<i>API</i>	AACCAACTTATGTACGAGTCCATCA	GTAAGGATGCTGGATTTGGTGCT
<i>TFL1</i>	TGTTCCAGGTCCTAGTGACCC	AAACCTATGTATCCCTATGCTTG
<i>ACTIN2</i>	GCCCTCGTTTGTGGGAATGG	AAGCCTTTGATCTTGAGAGC

1.2.3 植物基因组 DNA 提取 对传统的 CTAB 法^[20] 进行部分改良, 分别取用野生型拟南芥及 AFDL 的莲座叶各 100 mg 用于提取基因组 DNA。取 3 μL 基因组 DNA 于 0.8% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测, -20 °C 保存。

1.2.4 启动子片段的克隆 根据 Tair 网站 (<http://arabidopsis.org/>) 发表的 *API* 基因组 DNA 序列, 设计并合成了扩增引物 pF1 和 pR5, 引物序列见表 2, 下划线表示引入的酶切位点, 以莲座叶基因组 DNA 为模板进行扩增, 取 5 μL PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测片段大小。按照说明书进行胶回收、加尾以及 T 载体连接, 用热击法将重组质粒转入到大肠杆菌 *DH5 α* 感受态细胞, 在含有 Amp 的 LB 固体培养基上筛选出阳性克隆, 运用载体上多克隆

位点两端的通用引物进行菌液 PCR 检测, 并将阳性菌液送至英骏公司进行测序。

1.2.5 启动子序列及结构分析 将测序得到的野生型拟南芥以及 AFDL 的 *API* 启动子序列与 Tair 网站发表的 *API* 基因序列进行序列比对, 运用 Vector NTI Advance 10 软件进行序列分析, 并将 AFDL 的 *API* 启动子序列提交到在线分析软件 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalup.html>) 进行启动子调控元件分析^[21-22]。

1.2.6 表达载体构建及转化 以莲座叶基因组 DNA 为模板, 分别以 pF1-pR5 以及 pF2-pR5、pF2-pR6、pF3-pR5、pF3-pR6 为引物, 扩增含有不同 CArG box 的不同长度的 *API* 启动子片段, 引物信息见表 2。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收

表 2 *API* 基因不同启动子扩增引物及产物信息

片段	长度/bp	CArG box	正向引物(5' - 3')	反向引物(5' - 3')
pF1-pR5	3 579	1 + 2 + 3	<u>CTGCAGT</u> TTTGATGAAACCAATG	<u>ACTAGT</u> TTTTGATCCTTTTTTAAG
pF2-pR5	1 752	2 + 3	<u>AAGCT</u> TCGTTTCAAACACTCAGGAC	<u>ACTAGT</u> TTTTGATCCTTTTTTAAG
pF2-pR6	1 752	2	<u>AAGCT</u> TCGTTTCAAACACTCAGGAC	<u>ACTAGT</u> TTTTGATCGCTGTGTAAC
pF3-pR5	1 379	3	<u>AAGCT</u> TCGTGAAAACACCAAATA	<u>ACTAGT</u> TTTTGATCCTTTTTTAAG
pF3-pR6	1 379	无	<u>AAGCT</u> TCGTGAAAACACCAAATA	<u>ACTAGT</u> TTTTGATCGCTGTGTAAC

注: 下划线代表引入的酶切位点, 下划线斜体则表示引入的突变碱基。

后连接入克隆载体,并将此系列载体命名为 *pGEM-Teasy pAP1*。

正向引物 pF1 引入了 *Pst* I 的酶切位点, pF2 和 pF3 引入了 *Hind* III 的酶切位点; 反向引物 pR5 和 pR6 都引入了 *Spe* I 的酶切位点。将 *pGEM-Teasy pAP1* 上的启动子片段用相应的酶进行双酶切, 与经过相同双酶切的表达载体 *pCAMBIA-1304* 连接获得 GUS 表达载体, 将它们命名为 *pCAMBIA-1304 pAP1::GUS* 系列, 通过电击法将这些重组质粒导入农杆菌 GV3101 的感受态菌株, 菌液 PCR 鉴定阳性转化子。

按照 Clough 等发表的花浸法转化野生型拟南芥^[23], 用含有 $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 潮霉素的 1/2MS 培养基筛选阳性植株。

1.2.7 转基因植株的 PCR 检测 转基因植株长至抽薹时, 取 100 mg 莲座叶片提取基因组 DNA, 并以此为模板进行 PCR 检测, 分别以潮霉素抗性基因以及插入片段为检测对象, 以提高检测的准确性。检测引物如下: Hyg F (5'-ACTTCTACACAGCCATCG-GTCC-3') 和 Hyg R (5'-TATGTCCTGCGGGTAAAT-AGCTG-3'); 表达载体序列 1304 F (5'-GTATGTTGT-GTGAATTGTGAGC-3') 和插入片段上的 pR5 或 pR6。扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

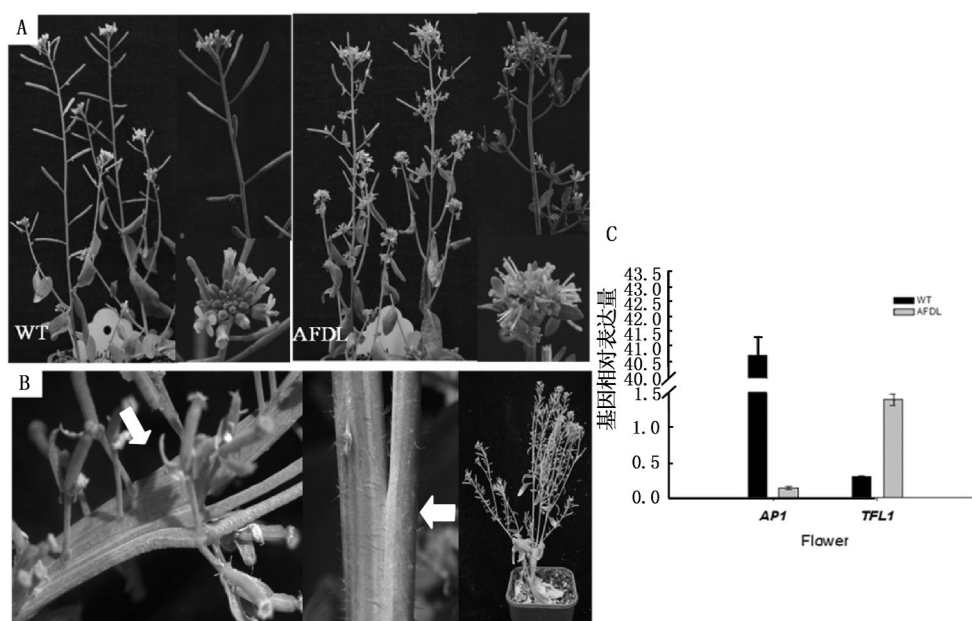
1.2.8 转基因拟南芥 GUS 染色及切片 采用 Cec-

chetti 等^[24] 的方法对 *pCAMBIA 1304 - pAP1::GUS* 系列转基因植株进行 GUS 组织化学染色观察。取用 PCR 检测的阳性转基因植株, 以花序为材料进行 GUS 组织化学染色。37 °C 温育过夜, 用 75% 酒精置换去除叶绿素至无色。材料经过酒精及叔丁醇的梯度透明、3 次浸蜡置换、包埋并切成 $8 \mu\text{m}$ 切片, 脱蜡后采用 Leica M 205FA 体视镜以及 Carl Zeiss 的 Axiocam MRc5 显微镜观察 GUS 染色部位的情况。

2 结果与分析

2.1 AFDL 表型及 *AP1* 表达分析

在利用拟南芥突变体筛选木材形成相关基因时得到 1 个花异常株系 AFDL, 该株系与拟南芥的主要差异表现在花瓣缺失及具有活跃的花序分生组织, 形成更多的高级花序并使整株的形态饱满紧凑 (图 1A), 并且有少数出现了多主茎同时从莲座叶中萌发或者多茎融合的表型 (图 1B), 这些植株能形成更多的分枝。基因表达分析表明: 在 AFDL 中 *AP1* 的表达量比野生型大约低 90 倍, 而花序分生组织基因 *TFL1* 的表达量上升了约 4.6 倍 (图 1B), *AP1* 能调控花瓣生长及花分生组织的分化, *TFL1* 能促进花序分生组织的分化, 这 2 个基因表达量的变化与 AFDL 的表型是相一致的。



A. 野生型与 AFDL 整株及花序的比较; B. AFDL 中出现的连体茎表型及整株形态, 箭头处表示多茎融合处; C. AFDL 和野生型拟南芥花序中 *AP1* 及 *TFL1* 的表达量分析

图 1 野生型拟南芥与 AFDL 的表型及基因表达

2.2 启动子序列及结构分析

为了研究野生型拟南芥与花异常株系 AFDL 在 *API* 基因的启动子区域是否存在差异,分别以二者的

基因组 DNA 为模板扩增了 *API* 基因的启动子片段。测序结果显示:野生型拟南芥与 AFDL 的 *API* 启动子片段的长度均为 3 759 bp,没有任何碱基差异。

表 3 *API* 启动子内感受环境刺激的主要基序信息表

基序	序列	数量/个	分布
ABRELATERD1	ACGTG	5	390 (+), 491 (+), 2 317 (+), 2 458 (+), 2 316 (-)
ACGTATERD1	ACGT	10	390 (+), 491 (+), 810 (+), 1 072 (+), 1 563 (+), 1 965 (+), 2 317 (+), 2 458 (+), 2 750 (+), 3 323 (+)
MYBIAT	WAACCA	12	79 (+), 1 275 (+), 3 441 (+), 3 469 (+), 3 492 (+), 50 (+), 1 990 (+), 497 (-), 1 538 (-), 1 982 (-), 2 675 (-), 3 450 (-)
MYBCORE	CNGTTR	10	743 (+), 2 996 (+), 3 065 (+), 54 (-), 2 619 (-), 2 822 (-), 106 (-), 982 (-), 1 032 (-), 1 623 (-)
MYCCONSUSAT	CANNTG	18	54 (+), 555 (+), 582 (+), 815 (+), 883 (+), 1 226 (+), 1 534 (+), 2 079 (+), 2 105 (+), 2 316 (+), 2 433 (+), 2 522 (+), 2 588 (+), 2 822 (+), 2 996 (+), 3 003 (+), 3 071 (+), 3 266 (+)
GT1CONSENSUS	GRWAAW	31	256 (+), 287 (+), 373 (+), 417 (+), 432 (+), 651 (+), 1 166 (+), 1 212 (+), 1 752 (+), 2 052 (+), 2 321 (+), 2 347 (+), 2 348 (+), 2 376 (+), 2 568 (+), 2 623 (+), 2 778 (+), 3 104 (+), 3 153 (+), 3 177 (+), 3 232 (+), 3 328 (+), 3 569 (+), 686 (-), 3 344 (-), 1 438 (-), 1 834 (-), 2 174 (-), 2 200 (-), 2 581 (-), 3 483 (-)
IBOXCORE	GATAA	7	417 (+), 459 (+), 1 212 (+), 1 752 (+), 3 104 (+), 3 328 (+), 687 (-)
INRNTPSADB	YTCANTYY	8	1 813 (+), 356 (+), 954 (+), 1 232 (+), 778 (-), 1 683 (-), 2 133 (-), 2 653 (-)
REALPHALGLHCB21	AACCAA	11	51 (+), 80 (+), 123 (+), 1 276 (+), 1 537 (-), 1 981 (-), 3 006 (-), 3 197 (-), 3 201 (-), 3 584 (-), 3 656 (-)
ERELEE4	AWTTCAAA	2	1 023 (+), 2 905 (-)
LECPLEACS2	TAAAATAT	2	1 656 (+), 1 044 (-)
GAREAT	TAACAAR	5	1 739 (+), 2 370 (+), 2 441 (+), 1 818 (-), 2 548 (-)
WRKY71OS	TGAC	16	22 (+), 1 395 (+), 1 527 (+), 2 083 (+), 2 437 (+), 2 563 (+), 2 696 (+), 2 774 (+), 2 884 (+), 3 263 (+), 512 (-), 1 074 (-), 1 382 (-), 2 016 (-), 3 001 (-), 3 245 (-)
NODCON1GM	AAAGAT	7	1 402 (+), 2 264 (+), 3 523 (+), 1 904 (-), 1 931 (-), 2 087 (-), 2 879 (-)
EBOXBNNAPA	CANNTG	18	54 (+), 555 (+), 582 (+), 815 (+), 883 (+), 1 226 (+), 1 534 (+), 2 079 (+), 2 105 (+), 2 316 (+), 2 433 (+), 2 522 (+), 2 588 (+), 2 822 (+), 2 996 (+), 3 003 (+), 3 071 (+), 3 266 (+)

将 AFDL 的 *API* 启动子序列提交到在线分析软件 PLACE 进行启动子元件分析,启动子元件预测结果显示:在 AFDL 的 *API* 启动子中除了转录必须的 TATA-box、GATA-box 以及 CAAT-box 等保守元件,还存在一些感应环境胁迫、光、水分、盐以及激素应答的元件,如响应参与水分胁迫的 ABRELATERD1、ACGTATERD1、MYBIAT、MYBCORE 以及 MYCCONSUSAT 等、光调节的 GT1CONSENSUS、IBOXCORE、INRNTPSADB 以及 REALPHALGLHCB21 等、乙烯应答因子 ERELEE4 和 LECPLEACS2、GA 应答因子 GAREAT 和 WRKY71OS,糖应答因子 NODCON1GM,ABA 应答因子 EBOXBNNAPA 等。*API*

启动子中多种作用元件的组成表明:*API* 基因的表达不仅受到了多种环境信号的调控作用还与不同阶段的生理过程相关,同时在 *API* 启动子区域还发现了 3 个 CArG box,分别位于起始密码子(ATG)前的 -2 999、-1 492、-18 bp 位点,将它们依次命名为 CArG1、CArG2 及 CArG3(图 2)。这 3 个 CArG box 的序列结构为 C(A/T)₈G,属于 MefCArG,与典型的 SRE 型 CArG box 的 CC(A/T)₆GG 结构相比略有差异,其结合能力比 SRE 型 CArG box 稍弱一些,但仍具有功能的 CArG box^[25]。

2.3 植物表达载体构建及转基因植株检测

测序结果表明:AFDL 在 *API* 启动子序列上并

没有发生变化,因此 *API* 表达量下降很可能是发生在转录调控水平上。在花发育过程中大多数的功能基因都是 MADS-box 基因,一般以二聚体的形式结合到 CArG-box 上。CArG box 对花发育途径中的功能基因有重要调控作用^[16,26-28]。对 *API* 启动子的长度以及 CArG box 进行了不同程度的删除,以此启动下游 *GUS* 基因的表达,根据花器官内的 *GUS* 染色

来研究 *API* 表达调控的模式。

pCAMBIA-1304 pAPI ::GUS 系列重组质粒的酶切结果表明:5 种 *API* 启动子片段都成功连入了克隆载体,同时将表达载体 *pCAMBIA 1304* 的 *CaMV35S* 启动子用相应的酶进行双酶切,最后通过 T4 连接酶将启动子片段连接到表达载体上,载体构建见图 3。

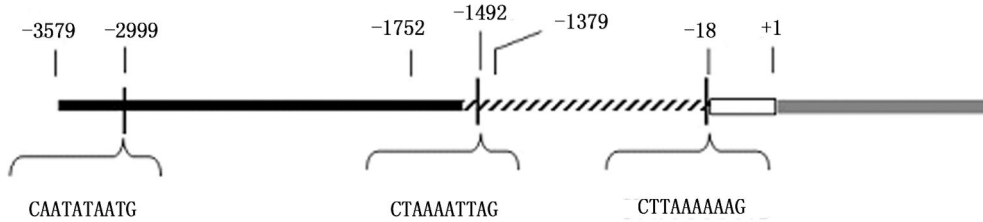
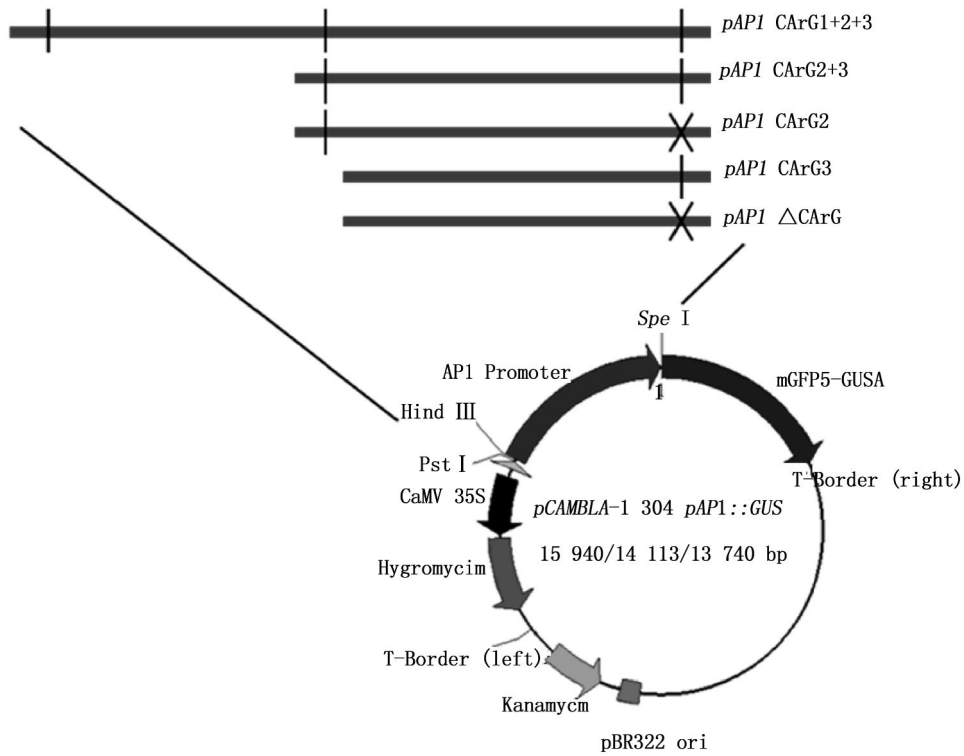


图 2 *API* 启动子中 CArG box 的位置及序列



竖黑线代表 CArG box; × 代表突变的 CArG box

图 3 *pCAMBIA 1304-pAPI ::GUS* 系列植物表达载体构建图

将以上构建好的 *pCAMBIA 1304-pAPI ::GUS* 系列表达载体通过电转法导入农杆菌 GV3101 中,在抗性培养基上的单菌落经 PCR 检测阳性克隆,通过农杆菌介导的花浸法将重组质粒转化到野生型拟南芥中,用含有潮霉素的 1/2MS 培养基进行转基因植株的筛选。2 周后将转基因幼苗移植到土壤中,并且提取其基因组 DNA,分别对启动子片段以及 Hyg 抗性基因进行了检测,获得了 *pAPI CArG1 + 2 + 3 ::*

GUS 转基因植株 26 株、*pAPI CArG2 + 3 ::GUS* 36 株、*pAPI CArG2 ::GUS* 24 株、*pAPI CArG3 ::GUS* 23 株、*pAP ΔCArG ::GUS* 22 株。

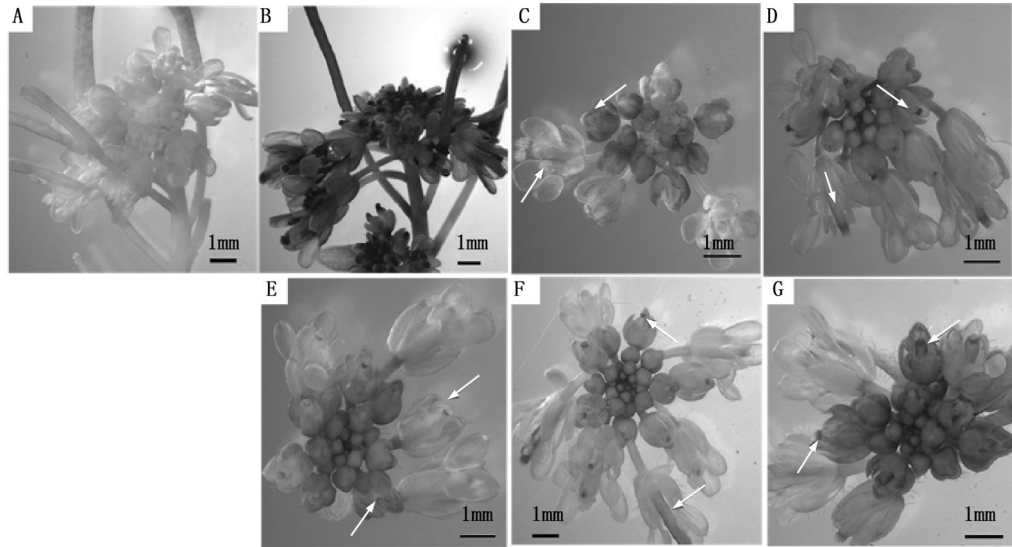
2.4 转基因植株 *GUS* 表达模式分析

pCAMBIA 1304-pAPI ::GUS 系列的 T₁ 代转基因植株经过 PCR 鉴定后,分别用 PCR 检测结果为阳性的转基因株系进行 *GUS* 组织化学染色,选取 *GUS* 染色阳性且有代表性的植株进行了进一步表达模式

分析(图4)。

以各种转基因植株的主茎和侧枝上的顶端花序为材料进行组织化学染色,结果显示:35S启动子下的GUS表达最强(图4B)。在不同长度的API启动子作用下,转基因植株表现出不同程度的GUS着色,其中,*pAPI CArG1 + 2 + 3::GUS*和*pAPI ΔCArG::GUS*转基因植株中的GUS表达更强烈。在转基因植株的萼片和花瓣中均能观察到GUS的表达,并且

在花梗以及茎生叶也出现了GUS着色,这与API原位杂交的研究结果相符^[29]。除此之外,在柱头以及果荚处也呈现出GUS着色(图4箭头标示处),在之前的API启动子研究中并没有出现相似的报告。本研究中启动子长度从-1 379 bp延长到-3 579 bp均出现异位表达,因此推测在API起始密码子前的-3 579 bp范围之外存在可能影响API组织特异表达的作用元件。



A. 野生型对照;B. 35S::GUS 阳性对照;C. *pAPI CArG1 + 2 + 3::GUS* 转基因植株;D. *pAPI CArG2 + 3::GUS* 转基因植株;E. *pAPI CArG2::GUS*;F. *pAPI CArG3::GUS* 转基因植株;G. *pAPI ΔCArG::GUS*;箭头所指为第4轮花器官出现的GUS染色。

图4 含有不同CArG box的API启动子的转基因植株GUS染色结果

为了研究CArG box在调控花发育各时期表达模式的作用,进行了花序的切片观察,切片结果见图5,花发育阶段按照David等^[30]的依据进行划分。

花发育早期,在第1时期茎分生组织转变成花分生组织并形成了花原基,此阶段只有*pAPI CArG1 + 2 + 3::GUS*植株表现出微弱的GUS信号;第2时期花原基继续膨大,*pAPI CArG2 + 3::GUS*植株和*pAPI CArG3::GUS*植株的花原基没有出现GUS信号,其它转基因植株中均能见到较弱的GUS染色,表明这2种植株中GUS的表达受到了抑制;进入第3时期几乎所有转基因植株的花原基中都出现了较明显的GUS染色;萼片原基在花发育第4时期开始形成,该阶段除了*pAPI CArG1 + 2 + 3::GUS*植株,其余4类植株在萼片上的GUS信号并不明显,CArG1可能起到了激活表达的作用。

花发育中期第5~6时期柱头及雄蕊逐渐形成,从图5中可以看到:此阶段各种植株的萼片上都表现出GUS染色,其中以*pAPI CArG1 + 2 + 3::GUS*植株最为明显,而在刚形成的花瓣原基上只有*pAPI*

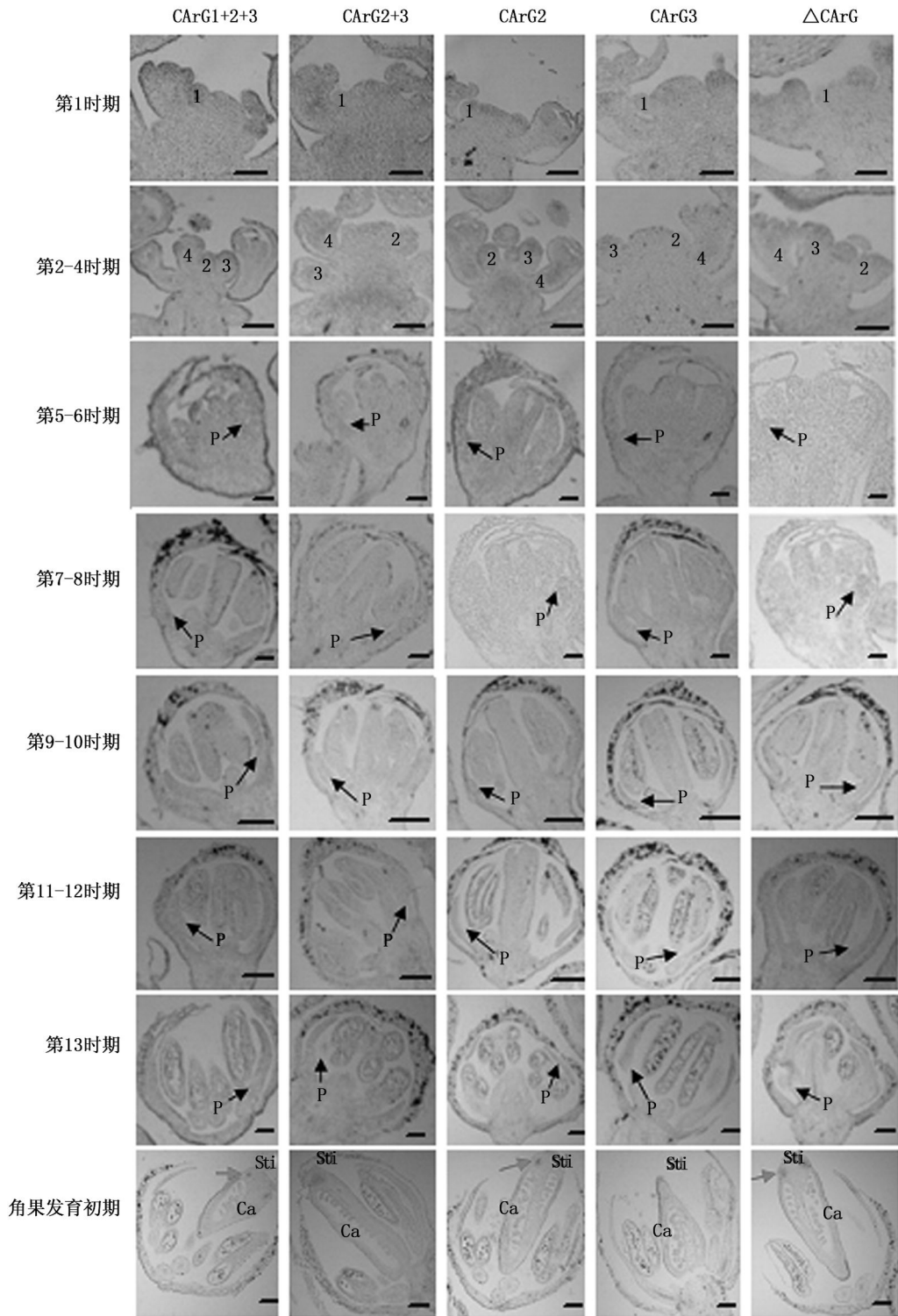
*ΔCArG::GUS*植株显现出GUS染色;在花发育中期的第7~8时期,除了*pAPI CArG2 + 3::GUS*和*pAPI CArG3::GUS*植株,其余3种转基因植株的花瓣上都出现了GUS信号,这表明含有CArG3的启动子在调控下游GUS转录时受到了抑制。

在花发育后期的第9~10时期:*pAPI CArG1 + 2 + 3::GUS*和*pAPI ΔCArG::GUS*的花瓣上GUS染色逐渐增强,而*pAPI CArG2::GUS*的染色稍弱,此前没有表现出GUS染色的*pAPI CArG2 + 3::GUS*及*pAPI CArG3::GUS*的花瓣上也表现出较弱的GUS染色;各启动子转基因植株在第11~12时期的GUS染色情况与第9~10时期基本一致。在第13时期,*pAPI CArG2 + 3::GUS*及*pAPI CArG3::GUS*转基因植株萼片上的染色明显比其它的植株弱,表明CArG3在此阶段能抑制GUS在萼片上的表达;而花瓣的染色以*pAPI CArG2 + 3::GUS*最弱,其次是*pAPI CArG2::GUS*和*pAPI CArG3::GUS*,其余2种植株在花瓣上均有明显的GUS染色,这说明在花发育后期CArG2和CArG3都能抑制GUS的表达,而

CAR_{G1} 则能完全抵消这种抑制作用并维持 GUS 的表达, 虽然不能排除在 -3 579 bp 至 -1 752 bp 区段也可能存在其它激活元件。

在角果形成初期, 第 4 轮花器官上显示出异位

表达的 GUS 信号, 从图 5 的纵向切片中可以看到: 各种启动子转基因植株的果荚以及柱头与果荚衔接处都有 GUS 染色, 这种异位表达与 CAR_G box 没有直接的联系。



角果发育初期时期箭头表示柱头中的 GUS 染色; P: Petal; Ca; Carpel; Sti; Stigma; 第 1 ~ 8 时期标尺为 100 μm, 第 9 ~ 13 时期标尺为 200 μm, 角果发育时期标尺为 400 μm。

图 5 花不同发育时期不同, *API* 启动子的转基因植株 GUS 染色切片

3 讨论与结论

通过分析 *API* 基因序列得知:AFDL 中 *API* 启动子的核苷酸序列并没有发生改变,排除了 AFDL 中 *API* 低表达由基因启动子序列突变造成的可能性,由此推测可能是转录水平上的调控作用或者是 *API* 区域结构变化如表观修饰才是引起 AFDL 中 *API* 表达受到抑制的原因。研究还发现:在 AFDL 中 *TFL1* 的表达量比野生型提高了约 6 倍。*TFL1* 与花分生组织基因 *API* 具有相互拮抗的作用,是引起花序分生组织活跃的重要调控因子,这导致其分生组织分化出更多的分枝,AFDL 的少数株系里出现了多茎分散或融合的表型,地上部分产生更多生物量。花序分生组织与茎分生组织之间的联系在以前的研究中多次被报道,在对杨树进行 *CEN/TFL1* 超表达的试验中发现,转基因杨树的整体形态结构发生了明显的变化,产生了更多的分枝^[10],并使顶端分生组织特性变得不明确,这与 AFDL 中增多的高级花序十分相似。拟南芥开花调控基因 *FT*、*CONSTANS (CO)* 在调控杨树次生生长以及生长周期上已得到了应用^[31-33],因此,可以借鉴拟南芥开花途径中已知的功能基因,重塑树木形态、增加木材产量、调节开花时间以及生长周期等。

为了进一步研究 *API* 启动子中的重要调控元件 CArG box 对转录调控的作用,对 *API* 启动子的长度以及 CArG box 数量进行了删减,通过转基因植株中 GUS 的时空表达模式来分析其功能。在花发育早期启动子能启动 GUS 在花原基的表达,随着花器官原基的形成,其表达局限在第 1、2 轮花器官,并且在花梗及花序基部也有表达,CArG1 能激活 GUS 较早的花原基中表达,而 CArG3 的抑制作用使得花原基中的 GUS 染色推迟至第 3 时期;在花发育中期,*pAPI CArG2 + 3::GUS* 及 *pAPI CArG3::GUS* 的植株在花瓣上的染色比其它类型植株出现的晚,且染色程度更弱,进一步说明在花发育中期 CArG3 对 GUS 的表达起到了抑制作用;在第 9 ~ 10 时期,*pAPI CArG3::GUS* 植株在花瓣上又出现了较弱的 GUS 染色,*pAPI CArG2 + 3::GUS* 植株在花瓣上的 GUS 染色比其它 3 类植株都弱,表明在该阶段 CArG2 对 GUS 的表达产生了一定的抑制作用;在整个花发育后期,*pAPI CArG2::GUS* 和 *pAPI CArG3::GUS* 的植株比 *pAPI ΔCArG::GUS* 植株在花瓣上的染色弱,表明 CArG2 和 CArG3 的抑制作用一直持续;但 *pAPI CArG1 + 2 + 3::GUS* 植株并没有出现 GUS 染色减弱的现象,推测含有 CArG1 的 -3 579 bp 至

-1 752 bp 的区域可能对下游基因表达具有较强的激活作用。

对比 *pAPI CArG1 + 2 + 3::GUS* 与 *pAPI CArG2 + 3::GUS*,*pAPI CArG2 + 3::GUS* 与 *pAPI CArG2::GUS* 及 *pAPI CArG3::GUS* 在各发育阶段的 GUS 表达情况,可知:*API* 启动子的 -1 752 bp 至 -1 379 bp 区域除 CArG2 之外的元件对其表达调控无明显作用。本研究还发现,各类转基因植株在角果形成初期,在角果顶端以及果荚出现了第 4 轮花器官出现的异位 GUS 信号,可能是由以下原因造成的:在 *API* 启动子 -3 579 bp 范围之外存在抑制其异位表达的作用位点,一旦缺失了这部分元件,*API* 就能在第 3、4 轮花器官里表达。此前的研究曾发现,很多基因的调控元件出现在基因的内含子甚至 3'-UTR 之外。通过删减启动子长度还发现,*API* 启动子 -3 579 bp 到 -1 752 bp 区段并不存在决定 *API* 表达的关键元件,这与文献 [29-30,34] 的研究结果一致,-1 700 bp 的启动子就能恢复强突变体 *ap1-1*,并且这一调控长度被缩减到 -1 379 bp。

实验结果显示:5 种不同的 *API* 启动子均能启动下游 GUS 的表达,同样在研究小麦春化作用应答机制时也发现,*VRN1* 启动子区内的 CArG box 并不是春化应答的必须元件,这表明一部分结合在 CArG box 基序上的作用因子并没有起到决定性的调控作用,只是在表达水平上进行调控。还有研究表明,*WUS* 的 3'-UTR 内的 CArG box 通过结合 PRC1 来改变其染色质结构,从而影响基因的表达水平^[16]。因此认为,在花异常株系 AFDL 中,*API* 表达受到抑制的原因可能是结合在 CArG2 和 CArG3 上的抑制子在 AFDL 中的表达量更高,从而使这种抑制作用转变成决定性作用,完全抑制下游基因表达,AFDL 中 *API* 启动子是否表现出与野生型拟南芥不同的表达模式还有待进一步的验证。

本研究证明了 *API* 基因启动子中 CArG box 对于 *API* 表达调控和表达模式有一定的作用,但还不能完全解释 AFDL 中 *API* 基因表达的显著降低,说明还有另外的调控因子作用于该基因调控序列或由于该基因组区域的表观遗传修饰调控 *API* 的表达,这些都有待于进一步研究;但 *API* 作为重要的调控因子,其功能不仅表现在调控花器官的形成与发育,也通过与开花途径中其它基因的相互作用来影响整个植株的形态、生长周期以及次生生长,研究拟南芥中 *API* 启动子调控模式对于揭示林木开花启动和发育过程的规律有着重要的指导意义。

参考文献:

- [1] Southerton S G, Strauss S H, Olive M R, *et al.* *Eucalyptus* has a functional equivalent of the *Arabidopsis* floral meristem identity gene *LEAFY*[J]. *Plant molecular biology*, 1998, 37(6): 897–910
- [2] Leseberg C H, Li A, Kang H, *et al.* MADS-box genes in dioecious aspen I: characterization of PTM1 and PTM2 floral MADS-box genes [J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2003, 9: 187–196
- [3] Kotoda N, Wada M, Kusaba S, *et al.* Overexpression of *MdMADS5*, an *APETALA1*-like gene of apple, causes early flowering in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Plant Science*, 2002, 162(5): 679–687
- [4] Pena L, Martín-Trillo M, Juárez J, *et al.* Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time[J]. *Nature biotechnology*, 2001, 19: 263–267
- [5] Coen E S, Carpenter R. The Metamorphosis of Flowers [J]. *The Plant Cell*, 1993, 5(10): 1175–1181
- [6] Ahn J H, Miller D, Winter V J, *et al.* A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1 [J]. *The EMBO Journal*, 2006, 25: 605–614
- [7] Yu H, Ito T, Wellmer F, *et al.* Repression of AGAMOUS-LIKE 24 is a crucial step in promoting flower development [J]. *Nature Genetics*, 2004, 36: 157–161
- [8] Bradley D, Ratcliffe O, Vincent C, *et al.* Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 1997, 275(5296): 80–83
- [9] Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, *et al.* A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals[J]. *Science*, 1999, 286(5446): 1960
- [10] Mohamed R, Wang C T, Ma C, *et al.* *Populus* CEN/TFL1 regulates first onset of flowering, axillary meristem identity and dormancy release in *Populus*[J]. *Plant Journal*, 2010, 62(4): 674–688
- [11] Parcy F, Nilsson O, Busch M A, *et al.* A genetic framework for floral patterning[J]. *Nature*, 1998, 395: 561–566
- [12] Sitaraman J, Bui M, Liu Z. LEUNIG HOMOLOG and LEUNIG perform partially redundant functions during *Arabidopsis* embryo and floral development [J]. *Plant Physiology*, 2008, 147(2): 672–681
- [13] Grandi V, Gregis V, Kater M M. Uncovering genetic and molecular interactions among floral meristem identity genes in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The Plant Journal*, 2012, 69(5): 881–893
- [14] Li D, Liu C, Shen L, *et al.* A Repressor Complex Governs the Integration of Flowering Signals in *Arabidopsis* [J]. *Developmental Cell*, 2008, 15(1): 110–120
- [15] Tilly J J, Allen D W, Jack T. The CArG boxes in the promoter of the *Arabidopsis* floral organ identity gene *APETALA3* mediate diverse regulatory effects [J]. *Development*, 1998, 125: 1647–1657
- [16] Liu X, Kim Y J, Müller R, *et al.* *AGAMOUS* terminates floral stem cell maintenance in *Arabidopsis* by directly repressing *WUSCHEL* through recruitment of Polycomb Group proteins [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(10): 3654–3670
- [17] Qi X L, Jiang Y, Tang F, *et al.* An *Arabidopsis thaliana* (Ler) inbred line AFDL exhibiting abnormal flower development mainly caused by reduced *API* expression[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2011, 56(1): 39–47
- [18] 丁峰, 彭宏祥, 罗聪, 等. 荔枝 *APETALA1* (*API*) 同源基因 cDNA 全长克隆及其表达研究[J]. *园艺学报*, 2011, 38(12): 2373–2380
- [19] 邹冬梅, 刘月学, 张志宏, 等. 草莓 *API* 同源基因的克隆, 表达及启动子分析[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(10): 1972–1981
- [20] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321–4326
- [21] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, *et al.* Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 [J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(1): 297–300
- [22] Prestridge D S. SIGNAL SCAN: a computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements [J]. *Computer applications in the biosciences*; CABIOS, 1991, 7(2): 203–206
- [23] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 1998, 16(6): 735–743
- [24] Cecchetti V, Pomponi M, Altamura M M, *et al.* Expression of *rolB* in tobacco flowers affects the coordinated processes of anther dehiscence and style elongation [J]. *The Plant Journal*, 2004, 38(3): 512–525
- [25] Winter K U, Weiser C, Kaufmann K, *et al.* Evolution of class B floral homeotic proteins: obligate heterodimerization originated from homodimerization[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2002, 19(5): 587–596
- [26] Benlloch R, Kim M C, Sayou C, *et al.* Integrating long-day flowering signals: a *LEAFY* binding site is essential for proper photoperiodic activation of *APETALA1* [J]. *The Plant Journal*, 2011, 67(6): 1094–1102
- [27] Riechmann J L, Krizek B A, Meyerowitz E M. Meyerowitz. Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins *APETALA1*, *APETALA3*, *PISTILLATA*, and *AGAMOUS* [J]. *Plant Biology*, 1996, 93(10): 4793–4798
- [28] Pidal B, Yan L, Fu D, *et al.* The CArG-Box Located Upstream from the Transcriptional Start of Wheat Vernalization Gene *VRN1* Is Not Necessary for the Vernalization Response [J]. *Journal of Heredity*, 2009, 100(3): 355–364
- [29] Irish V F. The flowering of *Arabidopsis* flower development [J]. *The Plant Journal*, 2010, 61(6): 1014–1028
- [30] Smyth D R, Bowman J L, Meyerowitz E M. Early Flower Development in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 1990, 2(8): 755–767
- [31] Bohlenius H, Huang T, Charbonnel-Campaa, *et al.* *CO/FT* regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees [J]. *Science*, 2006, 312(5776): 1040
- [32] Hsu C Y, Liu Y, Luthe D S, *et al.* Poplar *FT2* shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering [J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(8): 1846–1861
- [33] Krizek B A, Riechmann J L, Meyerowitz E M. Use of the *APETALA1* promoter to assay the in vivo function of chimeric MADS box genes [J]. *Sex Plant Report*, 1999, 12: 14–26
- [34] Mandel M A, Gustafson-Brown C, Savidge B, *et al.* Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1* [J]. *Nature*, 1992, 360: 273–277